

Синтез индолсодержащих аллоколхициноидов

Ситников Н.С.,^а Федоров А.Ю.,^а Вельдер Я.,^б Шмальц Г.-Г.^б^а Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, просп. Гагарина, 23, Нижний Новгород. Факс: (831) 465 8592; E-mail: nikolaj-sitnikov@ya.ru^б Department für Chemie, Universität zu Köln, Greinstr. 4, Köln 50939 (Germany). Fax: (+49) 222-470-3064; E-mail: schmalz@uni-koeln.de

Аллоколхициноиды, содержащие 1-метил-1*H*-индол-5-ильный фрагмент, были синтезированы с применением реакций кросс-сочетания Сузуки-Мияура и аннелирования по Фриделю-Крафтсу в качестве ключевых стадий формирования тетрациклического молекулярного скелета. Описано динамическое растворитель-зависимое конформационное равновесие полученных аллоколхициноидов. По результатам РСА анализа полученные соединения являются структурными аналогами природных анти tubулиновых агентов комбретастатина А-4 и аллоколхицина. Исследование противоопухолевой активности целевых соединений и ряда синтетических интермедиатов на линии клеток ВJАВ выявило высокую антimitотическую и апоптоз-индуцирующую активность (наномолярный/субнаномолярный концентрационный диапазон).

Введение

Колхицин **1**¹ (рис. 1) – основной алкалоид, выделяемый из *Colchicum autumnale*, (безвременника осеннего) – является эффективным ингибитором митоза и противовоспалительным агентом, использующимся в лечении подагры и средиземноморской лихорадки. Биологическая активность колхицина обусловлена его способностью связываться с внутриклеточным белком тубулином, ингибируя формирование митотического веретна и блокируя клеточный цикл на стадии метафазы.¹ В то время как низкий терапевтический индекс препятствует применению колхицина в противоопухолевой терапии, его уникальная молекулярная структура остается важным ориентиром в поиске новых лекарственных соединений. К числу недавно открытых структурных аналогов колхицина относятся аллоколхицин **2**,² комбретастатин А-4 (СА-4) **3**,³ 4-арилкумарины **4**⁴ –

соединения, проявляющие высокую антimitотическую активность и являющиеся многообещающими противоопухолевыми агентами.

Общей структурной характеристикой соединений **1-4** является наличие двух некопланарно расположенных полиоксизамещенных син-арильных фрагментов. Долгое время уникальный набор заместителей цикла В считался определяющим для эффективного взаимодействия молекулы с колхициновым сайтом белка тубулина.⁵ Тем не менее, недавние исследования в группе Шама⁶ и нашей группе⁷ показали, что замещение цикла В в комбретастатинах и 4-арилкумарины на гидрофобный 1-метилиндольный фрагмент ведет к цитотоксикам **5** и **6**, способным эффективно подавлять формирование веретена деления *in vitro*. С целью исследования влияния подобной структурной модификации на биологические свойства колхицина нами синтезированы индолсодержащие аллоколхициноиды **7a,b** (рис. 1).

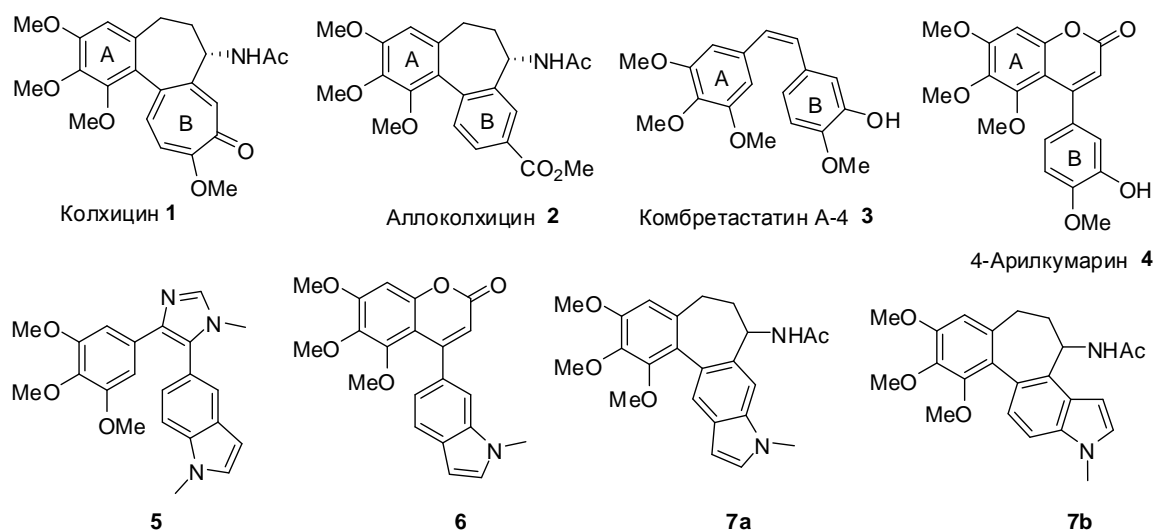


Рис. 1.

Целевые соединения **7a,b** были получены исходя из коммерчески доступных 3,4,5-триметоксифенилпропионовой кислоты **8** и пинаколята 5-индолилборной кислоты **9**. В качестве ключевых стадий формирования С-С связей были использованы реакции каталитического кросс-сочетания Сузуки-Мияура и внутримолекулярного ацилирования по Фриделю-Крафтсу (схема 1).

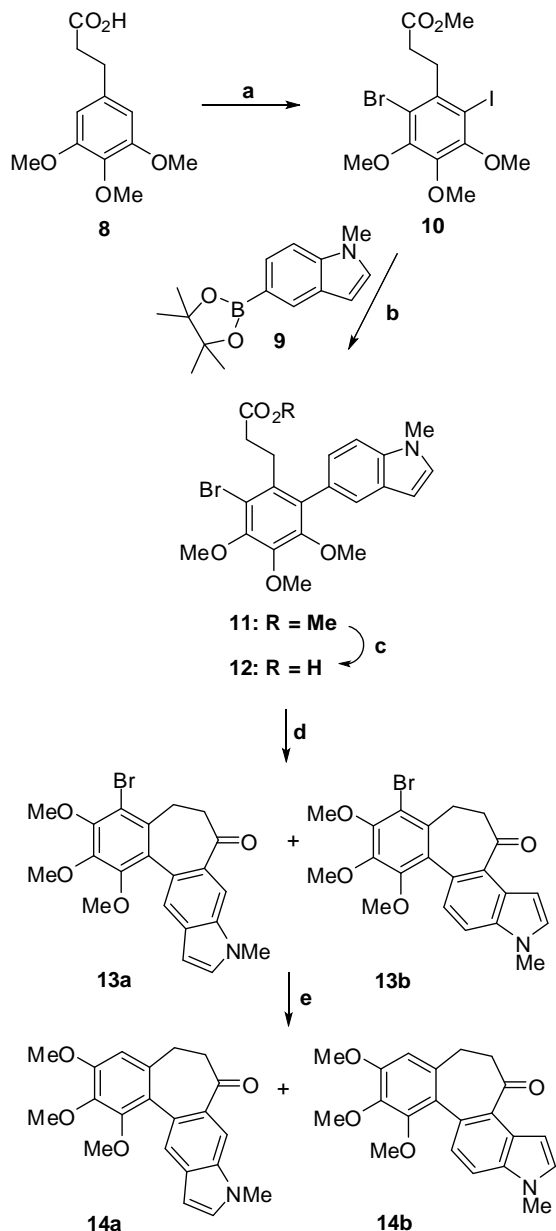


Схема 1

Реагенты и условия: (а) 1) Br_2 , AcOH , 5°C to r.t., 2 ч; 2) I_2 , $\text{AgO}(\text{O})\text{CCF}_3$, CH_2Cl_2 , r.t., 6 ч; 3) CH_2N_2 , Et_2O , r.t., 72% (3 стадии); (b) **18b**, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.03 экв.), Ph_3P (0.09 экв.), Cs_2CO_3 (1.5 экв.), ToIH , 110°C , 24 ч, 96%; (c) LiOH 1M аq., $\text{THF}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 50°C ; (d) 1) N,N,2 -триметил-1-хлорпропениламин, CH_2Cl_2 , -30°C , 12 ч; 2) конц. субстрата 0.02M в CH_2Cl_2 , ZnCl_2 , r.t., 2 ч; (e) AIBN , Bu_3SnH , ToIH , 110°C , 4h, 92% (**14a**), 92% (**14b**).

3,4,5-Триметоксифенилпропионовую кислоту **8** переводили в дигалогензамещенный эфир **10** путем последовательных реакций электрофильного бромирования (Br_2 , AcOH), йодирования

($\text{AgOC}(\text{O})\text{CF}_3$, I_2) и этерификации диазометаном (схема 1). Соединения **9**, **10** далее использовали в реакции Сузуки-Мияура.

Применение каталитической системы $\text{Pd}(\text{OAc})_2 - \text{PPh}_3 - \text{Cs}_2\text{CO}_3 - \text{ToIH}$ позволило осуществить кросс-сочетание двух электроннасыщенных фрагментов с высоким выходом. Карбоновую кислоту **12**, полученную после основного гидролиза сложноэфирной группы в биариле **11**, переводили в соответствующий хлорангидрид действием N,N,2 -триметил-1-хлорпропениламина (Ghosez reagent)⁸ и использовали *in situ* в реакции внутримолекулярного ацилирования по Фриделю-Крафтсу. После тщательной оптимизации условий проведения циклизации, региоизомеры **13a** и **13b** в соотношении 4:1 были получены с суммарным выходом 40%.

Полученная смесь региоизомеров далее использовали в реакции радикального восстановительного дегалогенирования, после проведения которой изомерные продукты **14a** и **14b** были разделены методом флэш-хроматографии на силикагеле. Использование соединений **14a** и **14b** в серии реакций превращения функциональных групп (восстановление карбонильной группы, нуклеофильное замещение гидроксильной группы на азидную в условиях Митсунобу, восстановление азидной группы и ацилирования аминогруппы в присутствии пиридина) позволило получить спектр индолсодержащих тетрациклических производных для скрининга противоопухолевой активности (схема 2).

Следует отметить, что соединения **15a,b**, **16a,b**,

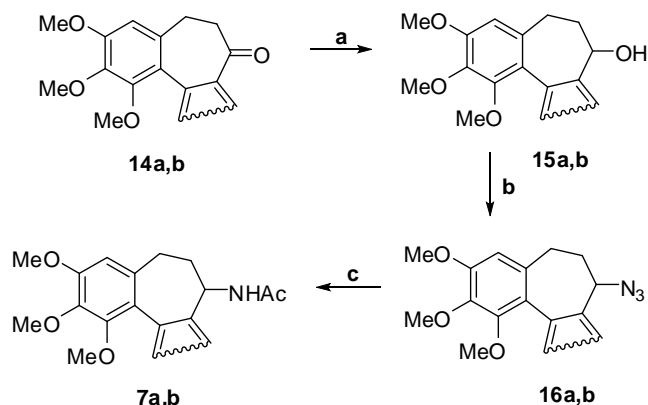


Схема 2

Реагенты и условия: а) NaBH_4 , $\text{THF}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, r.t., 3 ч, 92% (**15a**), 93% (**15b**); (b) $\text{Zn}(\text{N}_3)_2 \cdot 2\text{Py}$, PPh_3 , DIAD , ToIH , r.t., 0.5 ч, 89% (**16a**), 68% (**16b**); (c) 1) 1 M LiAlH_4 р-р в Et_2O , THF , r.t., 24 ч; 2) Ac_2O , Py , CH_2Cl_2 , r.t., 0.5 ч, 87% (**7a**, 2 стадии), 89% (**7b**, 2 стадии).

7a,b находятся в состоянии динамической атропизомеризации⁹ в растворе (рис. 2). По аналогии с природным (–)-(aR,7S)–колхицином,¹ эти молекулы имеют аксиальную (ось $\text{C}(12a)\text{--C}(12b)$) и центральную (ассимметрический центр $\text{C}(7)$) хиральность и существуют в виде смеси двух диастереомерных форм. Действительно, два набора сигналов присутствуют в ^1H и ^{13}C ЯМР спектрах **15a,b**, **16a,b**, **7a,b**, однако соотношение интенсивностей изменяется в зависимости от

Таблица 1

	колхицин 1	14a	14b	15a	15b	16a	7a	7b
IC ₅₀ [μM]	0.02	0.0025	< 0.001	0.03	0.008	0.2	0.08	0.03
AC ₅₀ [μM]	0.03	0.005	< 0.001	0.1	0.01	0.5	0.5	0.05

полярности растворителя (см. экспериментальную часть). Это свидетельствует о наличии динамического равновесия между двумя аксиальными конформациями. В случае соединений **7a,b** данное явление атропизомеризации осложняется наличием E/Z изомеризации амидной группы.

Противоопухолевая активность **14a,b**, **15a,b**, **16a** and **7a,b** была исследована на линии клеток BJAB (Burkitt-like lymphoma). Индуцирование апоптоза

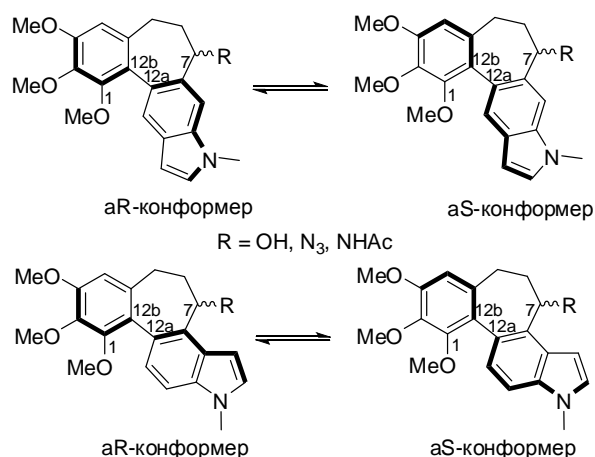


Рис. 2.

(AC₅₀) оценивалось путем анализа фрагментации ДНК (после 72 ч инкубации), ингибирование пролиферации оценивалось с помощью CASYR Cell Counter (после 24 ч инкубации).

Экспериментальная часть

Результаты анализа ЯМР спектров смеси атропизомеров аллоколхициноидов на примере соединения **7a** (1',2',3'-Триметоксибензо-[4',5':4,5]-1H-1-ацетамидо-6,7-дигидроциклогепта-[3,2-f]1H-1-метилиндол).

¹H ЯМР спектр, зарегистрированный в CDCl₃, содержит 3 набора сигналов с отношением интегральных интенсивностей 10:7:3, которые могут быть отнесены двум атропизомерам, для одного из которых наблюдаются ротамеры амидной группы:

1) ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 1.70 – 1.83 (m, 1 H, 6-H), 2.08 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.12 – 2.64 (m, 2 H, 5-H), 3.43 (s, 3 H, OCH₃), 3.79 (s, 3 H, NCH₃), 3.88 (s, 3 H, OCH₃), 3.93 (s, 3 H, OCH₃), 4.78 – 5.04 (m, 1H, 6-H), 5.93 – 5.99 (m, 1 H, 7-H), 6.46 (d, ³J = 3.1 Hz, 1 H, 3'-H), 6.55 (s, 1 H, 4-H), 7.01 (d, ³J = 3.1 Hz, 1 H, 2'-H), 7.16 (s, 1 H, 4'-H), 7.74 (s, 1 H, 7'-H).

2) ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 1.57 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.26 – 2.64 (m, 2 H, 5-H), 3.50 (s, 3 H, OCH₃), 3.79 (s, 3 H, NCH₃), 3.92 (s, 3 H, OCH₃), 3.93 (s, 3 H, OCH₃), 5.23 – 5.41 (m, 2 H, 7-H, 6-H), 6.48 (d, ³J = 3.1 Hz, 1 H, 3'-H), 6.65 (s, 1 H, 4-H), 7.05 (d, ³J = 3.1 Hz, 1 H, 2'-H), 7.30 (s, 1 H, 4'-H), 7.71 (s, 1 H, 7'-H).

3) ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 1.69 (s, 3 H, C(O)CH₃), 1.70 – 1.83 (m, 1 H, 6-H), 2.26 – 2.64 (m, 2 H, 5-H), 3.46 (s, 3 H, OCH₃), 3.80 (s, 3 H, NCH₃), 3.91 (s, 3 H, OCH₃), 3.94 (s, 3 H, OCH₃), 4.38 – 4.49 (m, 1 H, 6-H), 5.82 – 5.88 (m, 1 H, 7-H), 6.50 (d, ³J = 3.0 Hz, 1 H, 3'-H), 6.60 (s, 1 H, 4-H), 7.07 (d, ³J = 3.0 Hz, 1 H, 2'-H), 7.32 (s, 1 H, 4'-H), 7.71 (s, 1 H, 7'-H).

¹H ЯМР спектр, зарегистрированный в CD₃OD, содержит 1 набор сигналов:

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ = 1.84 – 1.97 (m, 1 H, 6-H), 2.05 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.17 – 2.35 (m, 2 H, 5-H), 2.42 – 2.53 (m, 1 H, 6-H), 3.42 (s, 3 H, OCH₃), 3.82 (s, 3 H, NCH₃), 3.88 (s, 6 H, OCH₃), 4.83 (dd, ³J = 6.0 Hz, ³J = 11.8 Hz, 1 H, 7-H), 6.42 (d, ³J = 3.1 Hz, 1 H, 3'-H), 7.13 (d, ³J = 3.0 Hz, 1 H, 2'-H), 7.32 (s, 1 H, 4'-H), 7.57 (s, 1 H, 7'-H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ = 22.76 (q), 31.65 (t), 32.87 (q), 40.25 (t), 50.78 (q), 56.58 (q), 61.22 (q), 61.63 (d), 101.68 (d), 104.05 (d), 108.89 (d), 123.12 (d), 126.77 (s), 127.71 (s), 128.70 (s), 130.19 (d), 134.92 (s), 136.68 (s), 137.78 (s), 142.32 (s), 152.20 (s), 153.54 (s), 172.38 (s).

MS (EI): m/z (%) = 191 (28), 206 (30), 218 (22), 234 (26), 248 (13), 261 (20), 277 (28), 291 (30), 304 (59), 320 (52), 335 (76), 394 (100) [M]⁺.

HRMS (EI): calcd. for C₂₃H₂₆N₂O₄ [M]⁺ 394.1892; found 394.188.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (09-03-00647-а), Совета по грантам при Президенте РФ (МД-5606.2010.3), Германской службы академических обменов (DAAD, A0879551).

Библиографический список

- Graening T., Schmalz H.-G. // *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**. Vol. 43. P. 3230.
- Boye O., Brossi A. in *The Alkaloids* (Eds.: A. Brossi, J. A. Cordell), New York: Academic Press, **1992**. Vol. 41. P. 125.
- Nam N.H. // *Curr. Med. Chem.* **2003**. Vol. 10. P. 1697–1722.
- Rappl C., Barbier P., Bourgarel-Rey V., Gregoire C., Gilli R., Carre M., Combes S., Finet J.-P., Peyrot V. // *Biochemistry*. **2006**. Vol. 45. P. 9210.
- Bhattacharyya B., Panda D., Gupta S., Banerjee M. // *Med. Res. Rev.* **2008**. Vol 28. P. 155.
- Wang L., Woods K.W., Li Q., Barr K.J., Mc Croskey R.W., Hannick S.M., Gherke L., Credo R.B., Hui I.H., Marsh K., Warner R., Lee J.Y., Zielinski-Mozng N., Frost D., Rosenberg S.H., Sham H.L. // *J. Med. Chem.* **2002**. Vol. 45. P. 1697.
- Ganina O.G., Daras E., Bourgarel-Rey V., Peyrot V., Andresuk A.N., Finet J.-P., Fedorov A.Yu., Beletskaya I.P., Combes S. // *Bioorg. Med. Chem.* **2008**. Vol 16. P. 8806.
- Devos A., Remion J., Frisque-Hesbain A. M., Colens A., Ghosez L. // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**. P. 1180.
- Vorogushin A. V., Wulff W. D., Hansen H.-J. // *J. Org. Chem.* **2003**. Vol. 68. P. 9618.
- Pietra F. // *J. Phys. Org. Chem.* **2007**. Vol. 20. P. 1102.